

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

18.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 4月18日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-116419

[ST.10/C]:

[JP2002-116419]

出 願 人

Applicant(s):

中外製薬株式会社

REC'D 13 JUN 2003

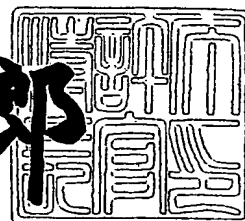
WIPO PCT

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月27日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3038868

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 020764

【提出日】 平成14年 4月18日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 31/34

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社  
社内

【氏名】 進士 修

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社  
社内

【氏名】 川邊 良樹

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区京橋2丁目1番9号 中外製薬株式会社内

【氏名】 小森 利彦

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル2  
06区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠式

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100080137

【弁理士】

【氏名又は名称】 千葉 昭男

【選任した代理人】

【識別番号】 100096013

【弁理士】

【氏名又は名称】 富田 博行

【選任した代理人】

【識別番号】 100098590

【弁理士】

【氏名又は名称】 中田 隆

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0107764

【プルーフの要否】 要

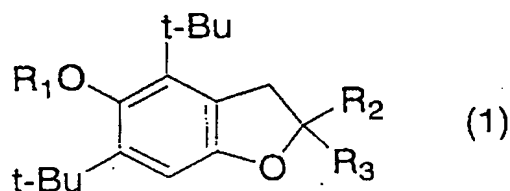
【書類名】 明細書

【発明の名称】 血管内皮の血管張力調節機能を改善するための医薬組成物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 血管内皮の血管張力調節機能を改善するための医薬組成物であって、式 (1) :

【化 1】



(式中、

$R_1$  は、水素原子、アシル基、またはアリールアルキルオキシカルボニル基であり；

$R_2$  および  $R_3$  は、同一でも異なってもよく、置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいアルケニル基または置換されていてもよいアルキニル基であるか、または

$R_2$  および  $R_3$  は、一緒になって、シクロアルキル基を形成してもよい。) で表される化合物またはその薬学的に許容できる塩を有効成分として含んでなる組成物。

【請求項 2】  $R_1$  が水素原子である、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】  $R_2$  および  $R_3$  が置換されていてもよいアルキル基である、請求項 2 記載の組成物。

【請求項 4】 置換されていてもよいアルキル基が、 $n$ -ブチル基、 $n$ -ペンチル基、 $n$ -ヘキシル基または  $n$ -ヘプチル基である、請求項 3 記載の組成物。

【請求項 5】 式 (1) で表される化合物が 4, 6-ジ- $t$ -ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ- $n$ -ペンチル-2, 3-ジヒドロベンゾフランである、請求項 1 記載の組成物。

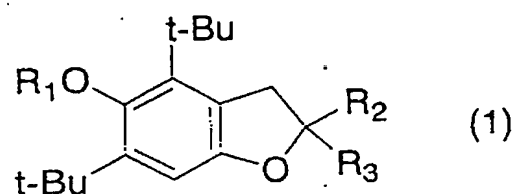
【請求項 6】 血管内皮の血管張力調節機能の改善を必要とする状態が、高

血圧、糖尿病および慢性閉塞性動脈硬化症からなる群から選択される疾病によってもたらされる、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 7】 血管内皮の血管張力調節機能の改善を必要とする状態が間欠性跛行である、請求項 6 記載の組成物。

【請求項 8】 血管内皮の血管張力調節機能を改善するための方法であって、そのような必要性のある患者に、有効量の式 (1) :

【化 2】



(式中、

$R_1$  は、水素原子、アシル基、またはアリールアルキルオキシカルボニル基であり；

$R_2$  および  $R_3$  は、同一でも異なってもよく、置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいアルケニル基または置換されていてもよいアルキニル基であるか、または

$R_2$  および  $R_3$  は、一緒になって、シクロアルキル基を形成してもよい。) で表される化合物またはその薬学的に許容できる塩を投与することを含んでなる方法。

【請求項 9】  $R_1$  が水素原子である、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】  $R_2$  および  $R_3$  が置換されていてもよいアルキル基である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】 置換されていてもよいアルキル基が、 $n$ -ブチル基、 $n$ -ペンチル基、 $n$ -ヘキシル基または  $n$ -ヘプチル基である、請求項 10 記載の方法。

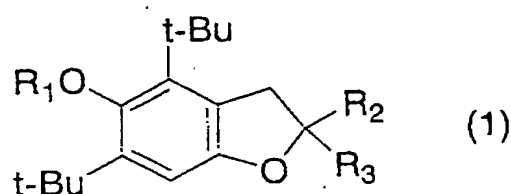
【請求項 12】 式 (1) で表される化合物が 4, 6-ジ- $t$ -ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ- $n$ -ペンチル-2, 3-ジヒドロベンゾフランである、請求項 8 記載の方法。

【請求項13】 血管内皮の血管張力調節機能の改善を必要とする状態が、高血圧、糖尿病および慢性閉塞性動脈硬化症からなる群から選択される疾病によってもたらされる、請求項8記載の方法。

【請求項14】 血管内皮の血管張力調節機能の改善を必要とする状態が間欠性跛行である、請求項13記載の方法。

【請求項15】 血管内皮の血管張力調節機能を改善するための医薬組成物の製造における、式(1)：

【化3】



(式中、

$R_1$  は、水素原子、アシル基、またはアリールアルキルオキシカルボニル基であり；

$R_2$  および  $R_3$  は、同一でも異なってもよく、置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいアルケニル基または置換されていてもよいアルキニル基であるか、または

$R_2$  および  $R_3$  は、一緒になって、シクロアルキル基を形成してもよい。) で表される化合物またはその薬学的に許容できる塩の使用。

【請求項16】  $R_1$  が水素原子である、請求項15記載の使用。

【請求項17】  $R_2$  および  $R_3$  が置換されていてもよいアルキル基である、請求項15記載の使用。

【請求項18】 置換されていてもよいアルキル基が、*n*-ブチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基または*n*-ヘプチル基である、請求項17記載の使用。

【請求項19】 式(1)で表される化合物が4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-ペンチル-2,3-ジヒドロベンゾフランである、請求項15記載の使用。

【請求項 2 0】 血管内皮の血管張力調節機能の改善を必要とする状態が、高血圧、糖尿病および慢性閉塞性動脈硬化症からなる群から選択される疾病によってもたらされる、請求項 1 5 記載の使用。

【請求項 2 1】 血管内皮の血管張力調節機能の改善を必要とする状態が間欠性跛行である、請求項 2 0 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、血管内皮の血管張力調節機能を改善するための医薬組成物および方法、ならびにそのような組成物の製造における一定の化合物の使用に関する。より特定すると、本発明は、高血圧、糖尿病および慢性閉塞性動脈硬化症などの成人病によってもたらされる血管内皮の血管張力調節機能の低下を改善するための医薬組成物および方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来技術】

高齢化社会を背景に、高血圧、糖尿病、動脈硬化および慢性閉塞性動脈硬化症などの成人病が年々増加し続けている。これら成人病に共通する特徴の一つは、発病に伴って血管病変が持続的に進行していく点である。こうした血管病変は穏やかに悪化してゆき、心筋梗塞のような深刻な疾病を発症させるリスクを増大させてゆく。この血管病変の進行過程で殊に注目されるのが、血管内皮細胞の障害による血管内皮の機能低下である。

血管内皮細胞は、血管の内腔を覆っている細胞である。それら細胞は、血管への物質透過を選択的に制御するだけでなく、血圧調節や抗血栓においても重要な役割を果たしていることが、近年明らかにされている。また、内皮細胞から分泌される血管内皮由来弛緩因子 (Endothelium-derived relaxing factor : E D R F) の存在が、血管内皮の血管張力調節機能に重要であることが最近明らかにされている。例えば、運動等により組織の酸素消費が増加した場合、その組織への酸素供給を増やす必要が生じるが、それは、その組織内の血管張力が弱められて、すなわち、血管内皮が弛緩されて、動脈血の流入が増加することにより達成

される。EDRFは、こうした場合に、血管内皮細胞から多く分泌されて、血管内皮の弛緩を促進していると考えられる。

#### 【0003】

したがって、高血圧や糖尿病などの成人病に伴う血管内皮細胞の障害により同細胞のEDRF分泌能力が低下すると、血管内皮の血管張力調節機能が害されることになる。その結果、高血圧、糖尿病、動脈硬化および慢性閉塞性動脈硬化症などの進行とともに、緊張した状態のまま弛緩できない血管が体内に多くなり、慢性的な狭窄または閉塞が起こるようになって心筋梗塞などが発症し易くなる。下肢動脈においてそうした慢性的な狭窄または閉塞が起こって発症する代表的な病態は間欠性跛行である。また、EDRF分泌能力の低下は、間欠性跛行以外の血管病変の病態生理にも重要な役割を演じている。このことは、種々の成人病においてEDRF分泌能力の低下が報告されていることから明らかである。従って、血管内皮細胞のEDRF分泌能力の低下を抑制できれば、高血圧、糖尿病、動脈硬化および慢性閉塞性動脈硬化症などの進行に伴う心筋梗塞や間欠性跛行のほか、他の血管病変を予防または治療することができる。

#### 【0004】

血管内皮細胞のEDRF分泌能力の低下を抑制することが報告されている薬剤に、高脂血症治療薬であるプロブコールがある。しかし、プロブコールを投与すると、高密度リポタンパク質コレステロール（HDL-C）が低下し、また、心電図のQT間隔が延長される。これら副作用は、虚血性心疾患および突然死に結びつくと考えられているので、そうした副作用を有さない、血管内皮細胞のEDRF分泌能力の低下を抑制する薬物、引いては、血管内皮の血管張力調節機能を改善する薬物の開発が求められている。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規な血管内皮の血管張力調節機能を改善するための医薬組成物を提供することを目的とする。

#### 【0006】

##### 【発明を解決するための手段】

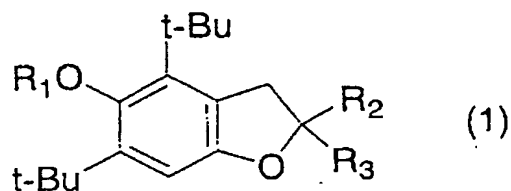


本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、特定のジヒドロベンゾフラン化合物が、血管内皮の血管張力調節機能を改善することを見出した。

すなわち、本発明は、血管内皮の血管張力調節機能を改善するための医薬組成物であって、式（１）：

【 0 0 0 7 】

【化 4】



【 0 0 0 8 】

（式中、

$R_1$  は、水素原子、アシル基、またはアリールアルキルオキシカルボニル基であり；

$R_2$  および  $R_3$  は、同一でも異なってもよく、置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいアルケニル基または置換されていてもよいアルキニル基であるか、または

$R_2$  および  $R_3$  は、一緒になって、シクロアルキル基を形成してもよい。）で表される化合物またはその薬学的に許容できる塩を有効成分として含んでなる組成物を提供する。

【 0 0 0 9 】

また、本発明は、血管内皮の血管張力調節機能を改善するための方法であって、そのような必要性のある患者に、有効量の式（１）で表される化合物またはその薬学的に許容できる塩を投与することを含んでなる方法も提供する。

さらに、本発明は、血管内皮の血管張力調節機能を改善するための医薬組成物の製造における、式（１）で表される化合物またはその薬学的に許容できる塩の使用も提供する。

好ましい態様において、式（１）で表される化合物は、４，６－ジ－*t*－ブチ

ル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-*n*-ブチル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン、4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-*n*-ペンチル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン、4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-*n*-ヘキシル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン、または4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-*n*-ヘプチル-2, 3-ジヒドロベンゾフランである。

好ましい態様において、血管内皮の血管張力調節機能の改善を必要とする状態は、高血圧、糖尿病および慢性閉塞性動脈硬化症からなる群から選択される疾病によってもたらされるものである。

より好ましい態様において、血管内皮の血管張力調節機能の改善を必要とする状態は間欠性跛行である。

#### 【0010】

本発明の式(1)で表される化合物は公知である。特開平6-206842号およびWO94/08930号には、それら化合物が抗酸化作用を有することが記載されている。また、特開平11-21238号およびWO98/50025号には、それら化合物が粥状動脈硬化病変および黄色腫を抑制することが記載されている。しかしながら、本発明の式(1)の化合物が血管張力調節機能を改善することは知られていない。

本発明で用いられる式(1)で表される化合物は、たとえば、特開平6-206842号、それに対応する米国特許5, 574, 178号またはヨーロッパ特許第0665208号に記載の方法によって合成することができる。

#### 【0011】

本発明の式(1)において、 $R_1$  についてのアシル基の例には、炭素数1~10の脂肪族アシル基および炭素数7~10の芳香族アシル基が含まれる。脂肪族アシル基の好ましい具体例には、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ヘキサノイル基などが含まれ、芳香族アシル基の具体例には、ベンゾイル基などが含まれる。アシル基としては、脂肪族アシル基が好ましく、炭素数1~6の脂肪族アシル基がより好ましく、特にアセチル基が好ましい。 $R_1$  についてのアリーラルアルキルオキシカルボニル基の例には、炭素数7~12のものが含まれる。好

ましい例には炭素数 7～11 のものが含まれ、より好ましい具体例には、ベンジルオキシカルボニル基およびナフチルメトキシカルボニル基などが含まれる。

$R_1$  は、水素原子またはアシル基であるのが好ましく、水素原子およびアセチル基がより好ましく、水素原子が特に好ましい。

#### 【0012】

$R_2$  および  $R_3$  についてのアルキル基には、炭素数 1～20 の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基が含まれる。具体的には、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*s*-ブチル、*t*-ブチル、*n*-ペンチル、イソペンチル、*sec*-ペンチル、*t*-ペンチル、ネオペンチル、*n*-ヘキシル、イソヘキシル、エチルブチル、*n*-ヘプチル、イソヘプチル、エチルペンチル、*n*-オクチル、エチルヘキシル、プロピルペンチル、ノニル、デシル、ペンタデシル、ステアリル基などが含まれる。アルキル基は、好ましくは、炭素数 1～10 の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基であり、より好ましくは、炭素数 3～8 の直鎖状のアルキル基である。

#### 【0013】

$R_2$  および  $R_3$  についてのアルケニル基には、炭素数 2～20 の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基が含まれる。具体的には、エテニル、プロペニル、イソプロペニル、ブテニル、イソブテニル、ペンテニル、イソペンテニル、ヘキセニル、イソヘキセニル、エチルブテニル、ヘプテニル、イソヘプテニル、エチルペンテニル、オクテニル、ノネニル、デセニル、ペンタデセニル基などが含まれる。アルケニル基は、好ましくは、炭素数 2～10 の直鎖もしくは分枝鎖状のアルケニル基であり、より好ましくは、炭素数 3～8 の直鎖状のアルケニル基である。

$R_2$  および  $R_3$  についてのアルキニル基には、炭素数 2～20 の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基が含まれる。具体的には、エチニル、プロピニル、イソプロピニル、ブチニル、イソブチニル、ペンチニル、イソペンチニル、ヘキシニル、イソヘキシニル、エチルブチニル、ヘプチニル、イソヘプチニル、エチルペンチニル、オクチニル、ノニニル、デシニル、ペンタデシニル基などが含まれる。アルキニル基は、好ましくは、炭素数 2～10 の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキニル基であり、より好ましくは、炭素数 3～8 の直鎖状のアルキニル基である。

## 【0014】

$R_2$  および  $R_3$  が形成するシクロアルキル基には、炭素数3～10のシクロアルキル基が含まれる。具体的には、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基、シクロオクチル基、シクロノニル基、シクロデシル基などが含まれる。シクロアルキル基は、好ましくは、炭素数5～8のシクロアルキル基であり、さらに好ましくは、炭素数4～7のシクロアルキル基である。

$R_2$  および  $R_3$  についての置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいアルケニル基および置換されていてもよいアルキニル基の置換基には、例えば、ハロゲン、低級アルキル基、低級アルケニル基、低級アルキニル基、ヒドロキシ基、アミノ基、モノまたはジアルキルアミノ基、カルボキシ基、アシル基、シアノ基、アルコキシ基、アリールオキシ基、ニトロ基、ハロゲノアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基が含まれ、ハロゲン、低級アルコキシ基、ヒドロキシ基、アミノ基、ニトロ基およびトリフルオロメチル基が好ましい。

特に好ましい  $R_2$  および  $R_3$  は、炭素数3～8の直鎖状の未置換アルキル基であり、具体的には、 $n$ -ブチル基、 $n$ -ペンチル基、 $n$ -ヘキシル基、 $n$ -ヘプチル基または $n$ -オクチル基であり、とりわけ  $R_2$  および  $R_3$  のいずれもが  $n$ -ペンチル基であるのが好ましい。

## 【0015】

本発明の式(1)で表される化合物の薬学的に許容できる塩は、式(1)の化合物が  $R_2$  または  $R_3$  において酸または塩基と付加塩を形成できる基を有する場合に形成され得る。酸付加塩の形成に使用される酸には、例えば、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸およびリン酸のような無機酸、および、例えば、酢酸、乳酸、シュウ酸、グリコール酸、酒石酸、りんご酸およびクエン酸のような有機酸が含まれる。また、塩基付加塩の形成に使用される塩基には、メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミン、ピリジン、ピペリジン、モルホリンおよびトリエチルアミンのような塩基が含まれる。

## 【0016】

本発明の式(1)で表される化合物の好ましい具体例は以下の通りである。

4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジメチル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン;

4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジエチル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン;

4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-*n*-プロピル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン;

4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-イソプロピル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン;

4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-*n*-ブチル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン;

4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-*s*-ブチル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン;

4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-*t*-ブチル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン;

4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-*n*-ペンチル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン;

4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-イソペンチル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン;

4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-*t*-ペンチル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン;

4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-ネオペンチル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン;

4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-*n*-ヘキシル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン;

4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-*n*-ヘプチル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン;

4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-*n*-オクチル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン;

4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-*n*-ノニル-2, 3

ージヒドロベンゾフラン；および

4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-*n*-デシル-2, 3-  
ージヒドロベンゾフラン

である。

特に好ましい式(1)で表される具体的化合物は、4, 6-ジ-*t*-ブチル-  
5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-*n*-ペンチル-2, 3-ジヒドロベンゾフランで  
ある。

#### 【0017】

本発明の式(1)で表される化合物は、血管張力調節機能の障害に対して優れた改善作用を示すので、例えば、高血圧、糖尿病および慢性閉塞性動脈硬化症などの成人病による血管内皮細胞の障害によって、血管内皮の血管張力調節機能が低下した場合に有用である。理論に拘束されることを望まないが、この血管張力調節機能の改善作用は、式(1)で表される化合物が、血管内皮細胞のEDRF分泌能力の低下を抑制する能力を有することによるものであろう。血管内皮の血管張力調節機能が低下した状態としては、特に下肢動脈において慢性的な血管狭窄または閉塞が起こった場合にみられる間欠性跛行が挙げられる。

#### 【0018】

本発明の医薬組成物は、有効成分である式(1)で表される化合物に、投与経路に応じて、生理的に許容される固体または液体の製剤担体を配合することで、各種の剤形に調製することができる。投与経路には、経口投与、静脈注射などの非経口投与、徐放性製剤による徐放性投与、および局所投与カテーテルなどによる局所投与が含まれる。製剤担体には、通常用いられる賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、被覆剤、溶解補助剤、乳化剤、懸濁化剤、安定化剤、油脂および溶剤が含まれる。剤形には、例えば、経口投与用、例えば、静脈内、筋肉内または皮下のような非経口投与用、口腔投与用、鼻内投与用、もしくは肛門投与用、または吸入もしくは吹き入れ用の剤形が含まれ、具体的には、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、水剤、シロップ剤、懸濁剤、乳濁剤、注射剤およびエアゾール剤が含まれる。

#### 【0019】

本発明の式（１）で表される化合物の投与量は、患者の年齢、症状の重篤度、投与経路などによって適宜選択されるが、一日あたり成人で、例えば１～１０００ｍｇ、好ましくは１０～５００ｍｇ、そしてより好ましくは５０～４００ｍｇである。この量は、１回に纏めて投与しても、数回に分けて投与してもよい。

以下に実施例をあげて本発明をより詳細に説明するが、本発明は、それら実施例に限定されるものではないことが理解されなければならない。

【００２０】

#### 【実施例】

#### 試験例１：酸化ＬＤＬにより障害を受けた血管内皮の血管張力調節機能の本発明化合物による改善作用（１）

酸化低密度リポタンパク質（酸化ＬＤＬ）により障害を受けたラット血管横断標本について、アセチルコリンによる血管内皮依存性の弛緩応答を本発明化合物の存在下で測定し、血管内皮の血管張力調節機能を改善する本発明の化合物の能力を評価した。

酸化ＬＤＬは、生体内物質である低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）が酸化ストレスを受けて変化したものであるが、血管内皮細胞の障害発生メカニズムに関与することが報告されている（Tanner FC, Noll G, Boulanger CM, Luscher TF, Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries. Role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide. Circulation. 1991, 83:2012-20）。この試験に使用される酸化ＬＤＬは、Havel らの方法（Havel R. J. et al, J. Clin. Invest., 34, 1345 (1955)) に従って調製されたリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）中の２００μｇ／ｍＬのウサギＬＤＬを、５μＭのＣｕＳＯ<sub>4</sub> とともに３７℃で２４時間インキュベーションすることにより作製されたものである。

【００２１】

まず、二酸化炭素の吸入により安楽死させたラットの腸間膜動脈を、Krebs 緩衝液（１１８．０ｍＭ ＮａＣｌ、４．７ｍＭ ＫＣｌ、２５．０ｍＭ ＮａＣＯ<sub>3</sub>、２２．５ｍＭ ＣａＣｌ、１．５ｍＭ ＭｇＳＯ<sub>4</sub> および１０ｍＭグルコースを含有する）中に採取し、その動脈を幅２ｍｍのリング状横断片になる

ように切断した。次いで、その切片をマグヌス装置に懸垂して、3 mNの張力で60分間平衡させた。平衡後、切片をKrebs緩衝液中の5  $\mu$ Mフェニレフィリン溶液で収縮させた。

#### 【0022】

安定した収縮が得られることが確認された後、灌流液を20  $\mu$ Mの被験化合物を含むKrebs緩衝液に置き換えた。被験化合物は、本発明化合物の4, 6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2, 2-ジ-*n*-ペンチル-2, 3-ジヒドロベンゾフラン、ならびに比較化合物としてのプロブコールおよび $\alpha$ トコフェロールであった。プロブコールは、血管内皮細胞のEDRF分泌能力の低下を抑制することで血管内皮の血管張力調節機能を改善することが報告されている化合物である。また、 $\alpha$ トコフェロールは、LDLの酸化を抑制することが知られている生体内脂溶性抗酸化物質である。

#### 【0023】

30分間灌流した後、100  $\mu$ g/mLの濃度の酸化LDLを加えた。

この酸化LDLを含む灌流液中で60分間平衡させた後、アセチルコリン (ACh) を $1 \times 10^{-10}$  Mから $1 \times 10^{-5}$  Mの濃度まで累積添加した。一定のACh濃度毎に切片の長さを測定し、弛緩前の切片の長さとの差を弛緩前の長さで除することにより弛緩度(%)を算出した。この弛緩は、アセチルコリンによる血管内皮細胞からのEDRFの放出の結果起こる現象である。

以上の実験に加えて、被験化合物を含むKrebs緩衝液中での灌流も酸化LDLを加えて平衡させる操作も行わなかった以外は、上記と同じように行った実験(コントロール実験)、および被験化合物を含むKrebs緩衝液中での灌流は行わずに、酸化LDLを加えて平衡させる操作を行った以外は、上記と同じように行った実験(酸化LDL実験)も行った。

#### 【0024】

図1から、本発明化合物は、酸化LDL実験より低い濃度のAChで酸化LDL実験と同程度の弛緩度を達成するので、血管内皮の血管張力調節機能を改善したと云える。例えば、50%の弛緩度は、酸化LDL実験では345 nMのAChで達成されたのに対して、本発明化合物では126 nMで達成された。ちなみ



に、コントロール実験では28 nM、プロブコールでは121 nM、そして $\alpha$ トコフェロールでは261 nMのAChで50%の弛緩度が達成された。

一方、 $\alpha$ トコフェロールは、酸化LDL実験と同程度の弛緩度しか示さないもので、この実験のACh濃度範囲では血管内皮の血管張力調節機能を改善しないと云える。このことは、LDLの酸化を抑制する能力を有する $\alpha$ トコフェロールでも、酸化LDLによる血管内皮細胞の障害の阻止やその障害によって低下した血管張力調節機能を改善することができないことを意味する。そして、そのことは、本発明化合物が有する血管張力調節機能の改善作用が、LDLの酸化の抑制により酸化LDLから血管内皮細胞への障害性を奪い去ることによって表面的に血管内皮の血管張力調節機能を改善したように見えるに過ぎないのではなく、実際に酸化LDLによる血管内皮の血管張力調節機能の障害を抑制したことを裏付けるものである。

【0025】

試験例2：酸化LDLにより障害を受けた血管内皮の血管張力調節機能の本発明化合物による改善作用（2）

被験化合物の濃度を20  $\mu$ から50  $\mu$ Mに高めた以外は、試験例1と同じようにして行った。

図2から、本発明化合物は、その溶液濃度を高めることにより、試験例1の場合より低いACh濃度で高い弛緩度を達成することが分かる。特に、そのACh濃度と弛緩度の関係がコントロールに近似したものであることは、酸化LDLによる血管内皮細胞への障害による血管張力調節機能への悪影響が完全に取り払われたことを意味する。

【0026】

【発明の効果】

本発明の化合物は、血管内皮細胞のEDRF分泌能力の低下を抑制することが報告されているプロブコールよりも安全性が高いので、高血圧、糖尿病、動脈硬化および慢性閉塞性動脈硬化症などの成人病に伴う、心筋梗塞の発症のリスクや間欠性跛行のような、血管張力調節機能が低下した状態の改善に極めて有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

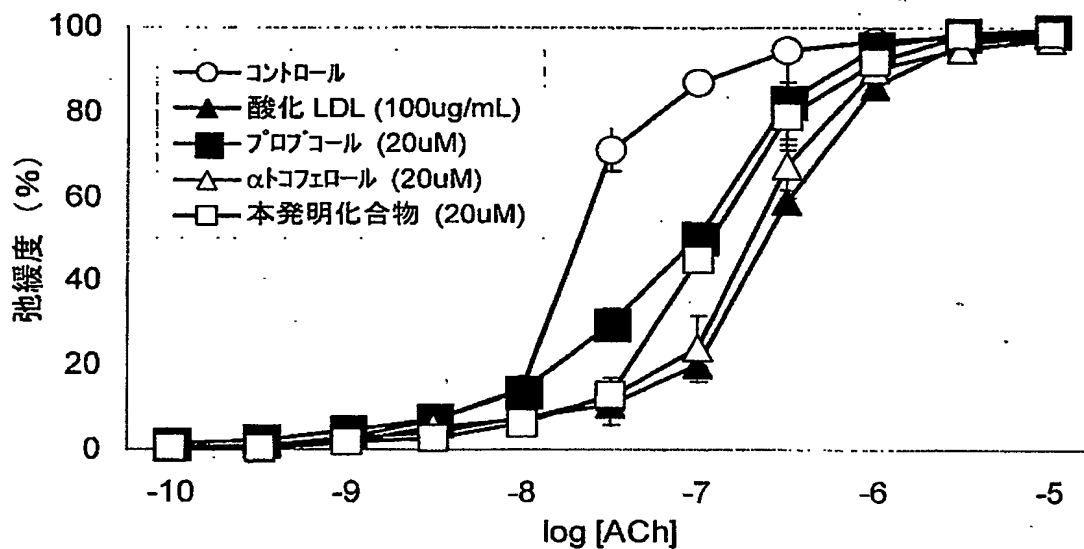
20  $\mu$ Mの被験化合物の溶液中に浸漬してから酸化LDLにより障害を受けたラット血管横断標本についてのアセチルコリンによる血管内皮依存性の弛緩応答を示したグラフである。

【図2】

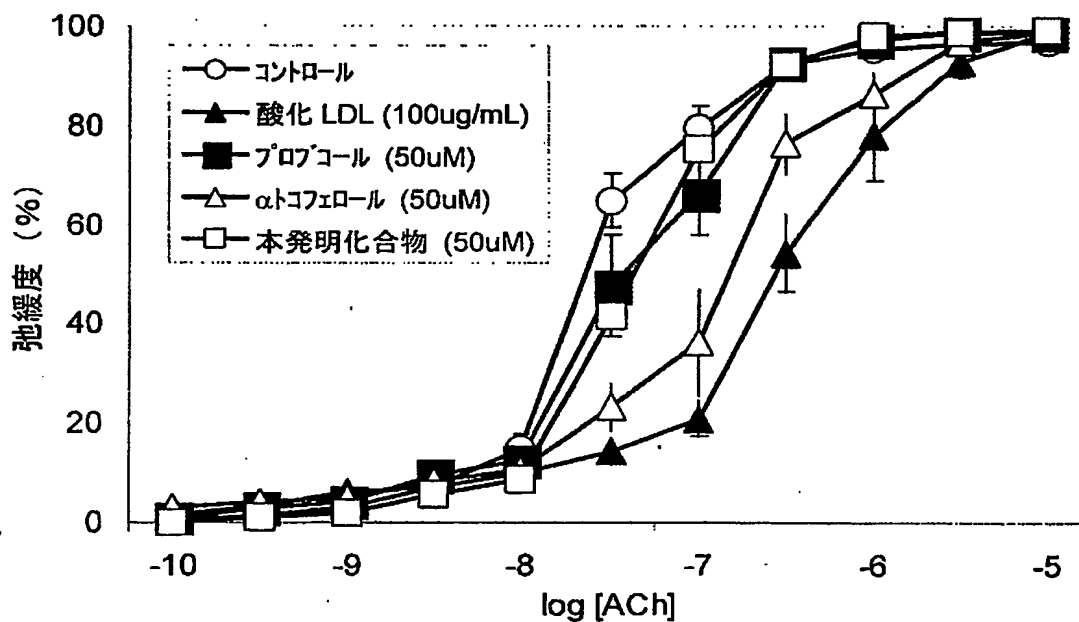
50  $\mu$ Mの被験化合物の溶液中に浸漬してから酸化LDLにより障害を受けたラット血管横断標本についてのアセチルコリンによる血管内皮依存性の弛緩応答を示したグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



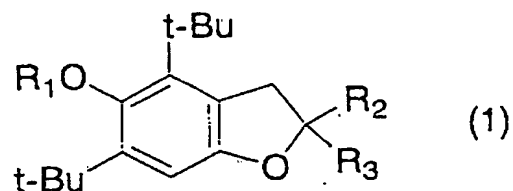
BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 要約書

【課題】 新規な血管内皮の血管張力調節機能を改善するための医薬組成物の提供。

【解決手段】 式(1)：

【化1】



(式中、 $R_1$  は、水素原子、アシル基、またはアリールアルキルオキシカルボニル基であり； $R_2$  および  $R_3$  は、同一でも異なってもよく、置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいアルケニル基または置換されていてもよいアルキニル基であるか、または  $R_2$  および  $R_3$  は、一緒になって、シクロアルキル基を形成してもよい。) で表される化合物を含んでなる組成物。

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[000003311]

1. 変更年月日	1990年 9月 5日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都北区浮間5丁目5番1号
氏 名	中外製薬株式会社